

# PCR 扩增及克隆基因

## PCR Amplification and Gene Cloning

徐远涛, 徐强\*

园艺植物生物学教育部重点实验室, 园艺林学学院, 华中农业大学, 武汉

\*通讯作者邮箱: [xuqiang@mail.hzau.edu.cn](mailto:xuqiang@mail.hzau.edu.cn)

引用格式: 徐远涛, 徐强. (2018). PCR 扩增及克隆基因. *Bio-101* e1010202. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010202.

How to cite: Xu, Y. T. and Xu, Q. (2018). PCR amplification and gene cloning. *Bio-101* e1010202. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010202. (in Chinese)

**实验原理:** PCR (polymerase chain reaction) 的原理是在模板 DNA、引物和 4 种脱氧核糖核苷酸 (dNTP) 存在的条件下, 依赖于 DNA 聚合酶的体外酶促合成反应。两个引物分别位于靶序列的两端, 同两条模板的 3'端互补, 由此限定扩增片段。PCR 反应由一系列的变性-退火-延伸反复循环构成, 即在高温下模板双链 DNA 变性解链, 然后在较低的温度下同过量的引物退火, 再在适中的温度下由 DNA 聚合酶催化进行延伸。由于每一循环的产物都可作为下一循环反应的模板, 因此扩增产物的量呈指数级增加。PCR 之后通过胶回收得到纯化的目的基因片段, 连接到克隆载体质粒中, 转入大肠杆菌细胞, 质粒随着大肠杆菌细胞的快速繁殖也快速复制, 富集大肠杆菌细胞抽提质粒即可得到大量的克隆质粒。

**实验目的:** 通过 PCR 扩增目的基因片段, 并利用大肠杆菌转化获得单克隆质粒, 用于测序、基因序列分析、特异探针构建及后续表达载体构建。

**关键词:** PCR, 大肠杆菌, 转化, 克隆, 质粒

### 材料与试剂

1. 各种型号枪头
2. 离心管
3. PCR 用八连管
4. 矿物油
5. 封口膜

6. 玻璃涂布棒
7. DNA 模板 (或 cDNA)
8. DNA 聚合酶 (Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase, 诺唯赞, catalog number: P505-d1)
9. dNTP
10. 引物
11. 双蒸水
12. Gene Ruler (Thermo Scientific Gene Ruler 1 kb DNA ladder, catalog number: SM0311)
13. 琼脂糖
14. 核酸染料 (GelRed)
15. 冰醋酸
16. NaCl
17. 胰蛋白胨
18. 酵母提取物
19. 琼脂粉
20. 琼脂糖胶纯化试剂盒 (Gel Extraction Kit, OMEGA, catalog number: D2500-02)
21. 克隆质粒 (Zero-Background P-Topo-Blunt Simple Cloning Kit, Aidlab, catalog number: CV17)
22. Trans 5 $\alpha$  *E. coli* 感受态细胞 (全式金生物科技有限公司)
23. 质粒提取试剂盒 (AxyPrep Plasmid Kit, AXYGEM, catalog number: 21515KA1)
24. TAE 缓冲液 (见溶液配方)
25. 氨苄霉素 (见溶液配方)
26. LB 培养基 (见溶液配方)

## 仪器设备

1. 涡旋仪
2. 小离心机
3. PCR 仪
4. 电泳仪

5. 凝胶成像系统
6. 切胶仪
7. 离心机 (配备 1.5 ml 转头)
8. 恒温水浴锅
9. 恒温摇床
10. 恒温培养箱
11. 酒精灯
12. 制胶槽
13. 梳子
14. 手术刀
15. 超净工作台
16. 细胞培养平板

## 实验步骤

### 1. PCR 引物设计

- 1.1 引物长度约为 16-30 bp，太短会降低退火温度影响引物与模板配对，从而使非特异性增高；太长则比较浪费，且难以合成。
- 1.2 引物中 G+C 含量通常为 40%-60%，可按下式粗略估计引物的解链温度  $T_m=4(G+C)+2(A+T)$ 。
- 1.3 引物  $T_m$  值控制在 55-65 °C 之间。
- 1.4 四种碱基应随机分布，在 3'端不存在连续 3 个 G 或 C，因这样易导致错误引发。
- 1.5 在引物内，尤其在 3'端应不存在二级结构。
- 1.6 两引物之间尤其在 3'端不能互补，以防出现引物二聚体，减少产量。两引物间最好不存在 4 个连续碱基的同源性或互补性。
- 1.7 引物 5'端对扩增特异性影响不大，可在引物设计时加上限制酶位点、核糖体结合位点、起始密码子、缺失或插入突变位点以及标记生物素、荧光素、地高辛等。通常应在 5'端限制酶位点外再加 1-2 个保护碱基。
- 1.8 正反向引物的  $T_m$  值以及 GC 含量应尽量一致；引物额外附加序列，即与模板非配对序列，不应参与  $T_m$  值计算。

1.9 推荐引物设计软件：Primer 5.0。

## 2. PCR 反应

2.1. 严格按照 DNA 聚合酶产品说明书在 PCR 仪上设置 PCR 反应程序，一般程序为：

Step 1: 95 °C	3 min	预变性
Step 2: 95 °C	30 s	变性
Step 3: 55 °C	30 s	退火
Step 4: 72 °C	30-60 s/kb	延伸，时间依据 PCR 产物长度而定
Step 5: goto Step 2-4, 34 个循环		循环扩增
Step 6: 72 °C	10 min	充分延伸
Step 7: 12 °C	30 min	反应种植，低温保存

2.2. PCR 反应体系：严格按照 DNA 聚合酶产品说明书配比。一般体系(50 µl)为：

2x PCR Buffer	25 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Primer F (10 mM)	2.5 µl
Primer R (10 mM)	2.5 µl
模板 DNA (100 ng/µl)	2 µl
Phanta DNA 聚合酶(2.5 U)	1 µl
双蒸水	16 µl

2.3. PCR 体系配好后轻微涡旋混匀，分装到八连管中，稍离心，每管滴入一滴矿物油。

2.4. 将配好体系的八连管放入 PCR 仪中，运行程序。

## 3. 琼脂糖凝胶电泳检测

3.1. 用 1x TAE 配制 1.5%浓度琼脂糖胶 (60 ml TAE 加 0.9 g 琼脂糖)，微波炉加热煮沸至琼脂糖完全溶解，自来水冷却至约 60-70 °C (体感可承受)，滴入一滴核酸染料，摇匀后倒入放有制胶托板的制胶槽 (中号，13x50 µl 孔)中，插入梳子 (50 µl)，冷却凝固 15 min。

3.2. 将 PCR 反应液全部加入到制好的琼脂糖胶孔中，加入适当大小的 Marker (一般为 1 kb Gene Ruler)，100 V 电泳 30 min。

- 3.3. 取出琼脂糖胶放入凝胶成像系统中拍照，检查扩增产物目标条带。
4. 目的条带回收纯化：参照 **Marker** 条带分子量大小，判断目的片段条带，用手术刀在紫外发光仪上切取目的条带胶块，参照胶回收试剂盒说明书回收纯化目的基因片段，并用 NanoDrop1000 检测胶回收产物浓度。
5. 目的片段与克隆载体连接：依据克隆载体说明书建立连接体系。

以 P-Topo-Blunt 载体为例：

P-Topo Vector	1 $\mu$ l
Enhancer Buffer	1 $\mu$ l
目的片段回收产物	20 ng/kb (依据产物长度而定)
双蒸水	补齐至 5 $\mu$ l

将以上试剂按顺序加入到 200  $\mu$ l 带盖 PCR 管中，然后在 PCR 仪上 25  $^{\circ}$ C 孵育连接，孵育时间根据目的基因片段长度而定，15 min/kb。

6. 转化感受态细胞：
  - 6.1. 开启超净工作台风机，紫外灯灭菌 15 min。
  - 6.2. 超低温冰箱中取出大肠杆菌感受态细胞(每管 100  $\mu$ l)放冰上融化，在超净工作台上用无菌的 1.5 ml 离心管将大肠杆菌感受态细胞分装为两管，每管 50  $\mu$ l。
  - 6.3. 在超净工作台上将连接产物全部加入到大肠杆菌感受态细胞中，轻轻吸打混匀，冰上孵育 30 min。此间打开恒温水浴锅，设置温度为 42  $^{\circ}$ C。
  - 6.4. 将孵育后的感受态细胞放入 42  $^{\circ}$ C 水浴锅中热激 90 s，迅速取出放冰上静置 2 min。
  - 6.5. 热激后的感受态细胞中加入 400  $\mu$ l 液体 LB 培养基，37  $^{\circ}$ C 恒温摇床上 220 rpm 转速培养活化 1 h。
  - 6.6. 取一瓶 150 ml 固体 LB 培养基在微波炉中加热融化后自来水降温至 60-70  $^{\circ}$ C，加入 150  $\mu$ l 氨苄霉素，摇匀后倒皿，制成细胞培养平板，冷却晾干。
  - 6.7. 酒精灯外焰烧玻璃涂布棒，冷却待用。
  - 6.8. 从活化 1 h 后的 400  $\mu$ l 菌液中吸取 200  $\mu$ l 到制好的细胞培养平板上，用烧过的玻璃涂布棒均匀涂皿至不能看到菌液，稍吹干。
  - 6.9. 将涂好的细胞培养皿用封口膜封口，倒置放入 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 12-16 h。

## 7. 挑取单克隆

7.1. 取一瓶 50 ml 液体 LB 培养基，超净工作台上加入 50  $\mu$ l 氨苄霉素摇匀，分装到无菌的 1.5 ml 中，每管 500  $\mu$ l。

7.2. 用 10  $\mu$ l 枪头在细胞培养平板上挑取单克隆斑点，在装有液体 LB 培养基的离心管中吸打 2-3 下，将菌斑接种到液体 LB 培养基中。每个平板挑取 8 个单克隆斑点。

7.3. 接种后的液体 LB 培养基在 37 °C 恒温摇床上 220 rpm 转速培养 5-8 h。

7.4. 菌液 PCR 检测阳性：吸取 0.5  $\mu$ l 菌液作为模板进行 PCR 反应扩增目的基因。

7.5. 根据菌液 PCR 检测结果，挑取 3-4 个阳性克隆菌液送公司测序。一般吸 200  $\mu$ l 菌液送测序公司检测，剩余菌液暂时放 4 °C 冰箱保存。

8. 单克隆质粒提取：根据测序结果，选取序列正确无误的阳性克隆菌液接种到 20-30 ml 含氨苄霉素的液体 LB 培养基中，37 °C 恒温摇床上 220 rpm 转速培养 12 h，用质粒提取试剂盒提取质粒。

## 注意事项

1. PCR 试剂应放在冰上融化，用完后及时放回-20 °C 冰箱。
2. PCR 是建立在一定量的模板和与之专一性互补配对的一对引物之上的，因此，在进行 PCR 前，模板的纯化和引物设计尤为重要。
3. 进行 PCR 实验时为了保证实验的可靠性，需要设置阴性对照（不加 DNA,以双蒸水为模板）和阳性对照（确定一定可以扩出目的条带的模板）。
4. 切胶回收时尽量只切取目的条带，切下胶块尽量薄，减少杂质污染。
5. 大肠杆菌转化过程均应在超净工作台操作，所用的离心管、枪头、培养基均需要 121 °C、15 min 灭菌。
6. 本实验所用的克隆载体 Topo-Blunt 为平末端克隆载体，高保真酶 PCR 产物一般均为平末端产物，所以可以直接连接转化。若用 Pmd18-T 载体（粘性末端）做 TA 克隆，用高保真酶 PCR 产物需要加 1  $\mu$ l Taq 酶 72 °C 孵育 5 min，在 PCR 产物 3'端加一个 A 碱基使之成为粘性末端（Taq 酶 PCR 产物 3'端会多出一个 A 碱基）。

## 溶液配方

### 1. TAE 缓冲液

先配制 50x TAE，称取 242 g Tris、37.2 g Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 倒入 1 L 蓝盖瓶中，然后加入 800 ml 的双蒸水，充分搅拌溶解，加入 57.1 ml 的冰醋酸，充分混匀。加双蒸水定容至 1 L，室温保存。需要使用的時候，稀释为 1x TAE 作为工作液。一般使用 10 L 的带嘴塑料壶，倒入 200 ml 50x TAE，再用双蒸水定容至 10 L，混匀备用。

### 2. 氨苄霉素

5 g 氨苄霉素粉末溶解于 100 ml 双蒸水中，配成浓度为 50 mg/ml 的氨苄霉素溶液，0.22 μm 微孔滤膜过滤灭菌后分装为 1 ml 每管，-20 °C 冻存。使用时以 1:1,000 的比例加入到 LB 培养基中，终浓度为 50 μg/ml。

### 3. LB 培养基

1 L 固体 LB 培养基成分为 10 g NaCl、10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、15 g 琼脂粉，加水定容至 1 L，121 °C、15 min 灭菌。液体 LB 不加琼脂粉。